



Proteomic and Lipidomic Analyses of Lipid Body Isolated from the Alkenone-producing Marine Haptophyte Alga *Tisochrysis lutea*

著者	史 青
発行年	2015
その他のタイトル	アルケノン合成能を有する海洋ハプト藻類の単離脂質体のプロテオミクスおよびリピドミクス解析
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2015
報告番号	12102甲第7528号
URL	http://hdl.handle.net/2241/00134932

氏名	史 青		
学位の種類	博 士 (理 学)		
学位記番号	博 甲 第 7528 号		
学位授与年月日	平成 27年 7月 24日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Proteomic and Lipidomic Analyses of Lipid Body Isolated from the Alkenone-producing Marine Haptophyte Alga <i>Tisochrysis lutea</i> (アルケノン合成能を有する海洋ハプト藻類の単離脂質体のプロテオミクスおよびリピドミクス解析)		
主査	筑波大学教授	理学博士	白岩 善博
副査	筑波大学教授	博士 (農学)	鈴木 石根
副査	筑波大学准教授	博士 (農学)	三浦 謙治
副査	筑波大学教授	博士 (理学)	石田 健一郎

論 文 の 要 旨

バイオディーゼル等の再生可能エネルギーに関する社会の関心の高まりに基づき、バイオ燃料生産、すなわち植物および藻類の脂質・オイル生産のメカニズムの解明に関する多くの研究が行われている。従来の研究は陸上植物に関する研究が多く、遺伝子改変技術の導入が可能なモデル植物やオイル含量の高い種子における脂肪酸や中性脂質の生産および代謝に関する知見が集積している。一方、藻類における脂質生産は、細胞膜や光合成膜（チラコイド膜）における脂肪酸合成や低温による不飽和化の研究がシアノバクテリアなどの遺伝子改変が可能な種において多くなされ、多くの知見が得られてきた。しかしながら、貯蔵脂質、すなわち中性脂質の生産に関する研究は特定の種に限られており、その知見は十分ではない。

このような状況において、学位申請者は海洋ハプト藻類が生産する脂質分子に関する代謝生理学的研究を行った。ハプト藻類の生産する脂質分子は、他の多くの藻類種が生産するトリアシルグリセロール (TAG) を生産する種に加え、長鎖不飽和ケトン（アルケノンと呼ぶ）を生産する種に大別される。本研究においては、後者のアルケノン生産ハプト藻種に焦点を当て、その生合成機構について研究した。アルケノンは有機地球科学者によって25年ほど前に海底堆積物から発見された。そしてその後、それがハプト藻類の生産物であることが明らかにされたものである。C₃₇-C₄₀からなる直鎖型炭素鎖に、トランス型炭素二重結合を有する分子であり、その生合成系に関する情報は皆無に等しい状況であった。さらに、単細胞からなる構造中に脂質体（オイルドロップ）が形成されるが、その組成に関しての情報はなく、脂質体とアルケノンの関連やそれぞれの局在に関する情報もない状況であった。その中で、本研究は、脂質体の単離法の確立と単離脂質体の化学組成の解析をリピドミクス解析とプロテオミクス解析の手法を駆使して行い、その関連性について解析した。

本研究においては、研究材料として、海洋性ハプト藻 *Tisochrysis lutea* (従来、*Isochrysis galbana* (T-iso) として記載) を用いた。ハプト藻類は、二次植物（二回の細胞内共生を経て進化した生物

群)であり、4重の葉緑体包膜を有する特徴を有し、光合成において機能するCO₂固定酵素として、リブローース-1,5-ジリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ(ルビスコ)に加え、動物型CO₂固定酵素として知られるピルビン酸カルボキシラーゼが葉緑体ストロマにおいて機能するユニークな特徴を有していることが所属研究室の先行研究で明らかにされている。

陸上植物における脂質体はTAGからなり、脂質蓄積種子ではオレオシンというタンパク質が一重の包膜の主要成分として局在することが報告されている。一方、淡水性単細胞緑藻クラミドモナスにおいては、MLDP (major lipid droplet protein) がTAGを主体とする脂質体の構成成分となっている。しかしながら、アルケノン生産藻類細胞における脂質体の情報は皆無であり、本研究でその解析を試みた結果、以下に示す結果を得たものである。

- (1) アルケノン生産ハプト藻 *T. lutea* の脂質体の単離法を確立した。その方法は、細胞破碎をフレンチプレスで行い、段階的ショ糖密度勾配遠心法によって最上清画分に脂質体を得る方法である。そして、これらの方法を用いて精製度の高い単離脂質体の調製に成功した。
- (2) 単離脂質体のGC-FID (gas chromatography with a Flame Ionization Detector)によるリピドミクス解析の結果、C₃₇およびC₃₈アルケノン (74.2%)、アルケン(1.2%)、ステロール類他(24.6%)が構成成分であることを明らかにし、その組成から本脂質体をアルケノンボディ(AB)と命名した。
- (3) 精製アルケノンボディの1DE (SDS-PAGE)ータンデム質量分析計を用いたプロテオミクス解析を行い、その主要構成タンパク質がアルケノン等の輸送に関わると推定される V-type H⁺-ATPase (V-ATPase)、次に アルケノン代謝に関わると推定される a hypothetical protein EMIHUDRAFT_465517、および小胞体膜の脂質ラフトに関わると推定される lipid raft-associated SPFH domain-containing protein であることを見出した。これらのデータは、小胞体もしくは4重包膜葉緑体の最外膜由来のER膜に包まれた構造体であることを明らかにした。
- (4) アルケノンボディはリン酸もしくは窒素欠乏下でその形成が促進されることを明らかにした。

本論文により、アルケノンボディ形成ハプト藻類種 *T. lutea* の脂質体組成とアルケノンの関係、およびその脂質体形成機構の一端が明らかとなった。

審 査 の 要 旨

本論文は、これまで全く情報がなくアルケノン研究者が強く求めていたアルケノンボディ形成ハプト藻類種 *T. lutea* の脂質体組成とアルケノンの関係、およびその脂質体形成機構の一端を、リピドミクス解析とプロテオミクス解析の両方を駆使して明らかにした。藻類における脂質合成機構を初めて明らかにしたそれらの成果の学術的意義とその価値は高いものと高く評価された。

平成27年6月2日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士(理学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。